

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

11 N° de publication :
(à utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 735 131

21 N° d'enregistrement national : 95 06909

51 Int Cl : C 07 K 5/107, 7/06, A 61 K 38/07, 38/08, 7/40

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 12.06.95.

30 Priorité :

43 Date de la mise à disposition du public de la demande : 13.12.96 Bulletin 96/50.

56 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule.

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71 Demandeur(s) : SOCIÉTÉ D'ÉTUDE ET DE RECHERCHE DE PATHOLOGIE APPLIQUÉE SERPA SOCIÉTÉ CIVILE — FR.

72 Inventeur(s) : DUSSOURD D HINTERLAND LUCIEN et PINEL ANNE MARIE.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire : REGIMBEAU.

54 CONJUGUÉS D'MSH AVEC UN ACIDE GRAS, LEUR PROCÉDE DE PRÉPARATION ET LEUR UTILISATION A TITRE DE MÉDICAMENT.

57 L'invention concerne un conjugué peptidique, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence peptidique comprenant au moins une séquence de 4 acides aminés dérivés de l'αMSH, les acides aminés étant sous forme naturelle ou non, ladite séquence étant conjuguée, chimiquement ou physiquement avec des acides sélectionnés parmi :

- les acides di-carboxyliques formule générale I
 $\text{HOOC} - \text{R1} - \text{COOH}$ (I)

dans laquelle R1 représente un radical alkylène, linéaire ou ramifié, comprenant au moins 3 atomes de carbone, de préférence de 3 à 10 atomes de carbone, éventuellement substitués, notamment par un ou plusieurs groupes amino ou hydroxy, et

- Les acides gras α-monoin saturés de configuration cis ou trans, de préférence trans, de formule générale II
 $\text{R2} - \text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$ (II)

dans laquelle R2 représente un radical alkyle, linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence de 6 à 10 atomes de carbone, substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo.

FR 2 735 131 - A1



La présente invention a pour objet la réalisation de dérivés peptidiques homologues de l' α MSH ou Mélanotropine, obtenus par synthèse chimique, présentés sous forme de lipo-peptides.

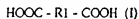
L' α MSH et ses homologues ont fait l'objet de nombreuses publications, voire même d'essais thérapeutiques sans que cela se traduise par la réalisation d'un médicament. La raison principale est l'extrême ubiquité de l' α MSH en fonction des doses administrées et des voies d'administration.

De plus, l'absence de relation doses / effets (ce qui est le cas de nombreuses hormones peptidiques) complique sérieusement son utilisation thérapeutique. En effet, les récepteurs cellulaires de l' α MSH et de ses homologues sont du type G et la transduction intra-cellulaire s'effectue selon le cycle de l'AMP cyclique, l'activation de ces récepteurs cellulaires est sensiblement inversement proportionnelle aux doses d'hormones peptidiques, acceptées par les structures du récepteur membranaire.

La présente invention repose sur la recherche de structures peptidiques spécifiquement orientées vers les activités anti-allergiques et anti-inflammatoires d'une part, et activatrices de la mélanogénèse d'autre part à l'exclusion de tout autre effet pharmacologique notamment au niveau du système nerveux central, comme du système nerveux périphérique.

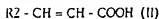
Plus particulièrement, la présente invention concerne un conjugué comportant une séquence peptidique comprenant au moins une séquence de 4 acides aminés dérivés de l' α MSH, les acides aminés étant sous forme naturelle ou non, ladite séquence étant conjuguée, chimiquement ou physiquement avec des acides notamment dérivés d'acides à activités métaboliques connues, sélectionnés parmi :

- les acides dicarboxyliques de formule générale I



dans laquelle R1 représente un radical alkylène, linéaire ou ramifié, comprenant au moins 3 atomes de carbone de préférence ayant de 3 à 10 atomes de carbone, éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino ou hydroxy, et

- les acides gras α -monoinsaturés de formule générale II



dans laquelle R2 représente un radical alkyle, linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence de 6 à 10 atomes de carbone éventuellement substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo, ces acides ayant la configuration cis ou trans, de préférence trans.

- 5 La séquence de l' α MSH est la suivante :

N-acétyl-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phé-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

- Dans ce qui suit, lorsque l'on mentionne les séquences provenant de l' α MSH il faut entendre que les acides aminés peuvent être sous forme D, L, ou D,L ou bien sous les formes non naturelles des acides aminés correspondant à des dérivés, notamment substitués, halogénés par exemple.

- 10 Les peptides conjugués de bas poids moléculaire selon l'invention sont avantageusement liés sous forme de sels, d'esters ou d'amides, à des acides possédant des fonctions métaboliques essentielles dans l'activation du cycle tricarboxylique cellulaire tels qu'ils sont décrits précédemment.

- 15 Les acides de formules générales I ou II sont de préférence choisis parmi les diacides carboxyliques pour lesquels R1 représente un reste alkylène en C₄-C₈, substitué ou non, en particulier les acides adipiques, α -amino-adipiques et dérivés, l'acide sébacique et dérivés, les acides gras α -monoinsaturés pour lesquels R2 représente un reste alkyle, linéaire ou ramifié en C₇, en particulier les acides hydroxydécénoïques, et décénoïques, sous forme des sels, esters, ou amides correspondants.

- Il s'agit de préférence de l'acide adipique ou "acide hexanedioïque" (ADIP), de l'acide α -amino adipique (2-amino hexanedioïque), de l'acide sébacique ou acide décanedioïque, de l'acide trans - 10 - hydroxy - Δ^2 -
25 décénoïque ou acide trans-hydroxy - 10 - décéne - 2 - oïque (AH), et de l'acide trans-oxo - 9 - décéne - 2 - oïque (9 - ADO).

Parmi ces acides, figurent préférentiellement pour des applications en phase soluble dans l'eau, les acides adipiques et amino-adipiques.

- 30 Parmi les acides figurent les acides gras suivants plus particulièrement adaptés pour l'obtention de dérivés peptidiques liposolubles, l'acide sébacique et ses dérivés, l'acide oxo-décéné-oïque, et l'acide trans-hydroxy-décénoïque, définis précédemment, et dont les activités biologiques sont liées à leurs propriétés, anti-androgène, anti-séborrhéique et lipolytiques (Madéa et coll., Nippon, Hifuka - 98 (4) p. 469 - 1988).

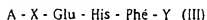
Plus spécifiquement, la présente invention concerne des peptides activateurs de la mélanogénèse, anti-allergique et anti-inflammatoire.

La séquence de 4 acides aminés provenant de l' α MSH, des conjugués selon l'invention, comprend de préférence au moins l'une des séquences peptidiques suivantes :

- Glu - His - Phé -
- His - Phé - Arg -
- Glu - His - Phé - Arg -

dans laquelle Phé représente la phénylalanine ou un dérivé halogéné de la phénylalanine, notamment D-homo-Phé et parafluoro-Phé les acides aminés pouvant être sous forme D, L, ou D,L

D'une manière avantageuse, les conjugués selon l'invention répondent à la formule générale III :



dans laquelle

A est un acide de formules générales I ou II telles que définies ci-dessus, en particulier l'acide adipique, ou l'acide α -amino adipique, l'acide sébacique, l'acide trans-oxo-9-décène-2-oïque ou l'acide trans-hydroxy-10-décène-2-oïque,

X représente un groupe 5-Me.Norleucine (Me.Nle), 2-N-Me-Norleucine (N-Me.Nle), OH ou NH_2 ,

Y représente un reste Arg - Z ou Z dans lequel Z est Trp - Gly - OH, Trp - OH, OH, Trp - Gly - NH_2 , Trp - NH_2 , ou NH_2 ,

Phé représente un reste D-Homo-Phé ou para-fluoro-Phé,

les acides aminés étant sous forme D, L ou D,L

La présente invention concerne particulièrement les dérivés peptidiques suivants :

- 1 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH_2
- 2 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - NH_2
- 30 3 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - NH_2
- 4 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - NH_2
- 5 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - NH_2
- 6 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - NH_2
- 7 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - NH_2

- 8 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - NH₂
- 9 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂
- 10 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - NH₂
- 11 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - NH₂
- 12 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - NH₂
- 5 13 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
- 14 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - OH
- 15 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - OH
- 16 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
- 17 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - OH
- 10 18 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
- 19 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - OH
- 20 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - OH
- 21 A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
- 22 A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - OH
- 15 A étant défini ci-dessus, ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels d'esters ou d'amides.

Dans les conjugués 1 à 22 ci-dessus, la position de l'acide A correspond au dérivé ester ou amide, la fraction acide carboxylique de l'acide assurant la liaison.

- 20 Les séquences d'acides-amino mentionnées précédemment peuvent être des séquences d'acides-amino naturels ou des séquences d'acides-amino non naturels. De même dans certains cas il est possible que certains de ces acides-amino comportent des fonctions par exemple des glycosylations. Il doit être entendu que la présente invention concerne également l'ensemble de ces formes comprises par la présente description.
- 25

La présente invention concerne également des médicaments contenant un ou plusieurs des conjugués selon l'invention.

La présente invention concerne également l'utilisation de ces composés dans le domaine de la cosmétique.

- 30 La présente invention concerne également des compositions galéniques, pharmaceutiques, dermo-cosmétiques ou cosmétiques comprenant un composé tel que défini précédemment.

Ces compositions peuvent se présenter sous l'une des formes connues dans les domaines cosmétiques bien que les formes topique et parentérale soient préférées.

35

Ces compositions sont utilisables aussi bien dans le domaine humain que vétérinaire.

Un des objets de la présente invention est l'application par voie topique et parentérale des conjugués peptidiques précédents. Les compositions pharmaceutiques peuvent être sous forme administrable par voie orale ou parentérale, injectable notamment, mais de préférence sous forme administrable par voie topique externe.

Ces compositions peuvent être notamment, sous forme de crème, spray, ou lotion par exemple et comporter des excipients connus et éventuellement d'autres principes actifs. Avantageusement, il s'agit de préparations dermo-cosmétologiques sous forme de solutions, de lotions d'émulsions, ou de crèmes utilisées comme accélérateur de bronzage de la peau, sans exposition aux U.V.

Les composés selon la présente invention sont utiles notamment dans la prévention et le traitement des allergies notamment cutanées, des réactions inflammatoires, et des troubles de mélanogénèse.

Les conjugués dont la séquence peptidique possède en position 4 l'acide para-fluoro-phényle (dérivés peptidiques 5 à 8 et 18 à 22), sont particulièrement orientés vers une activité biologique anti-allergique et anti-inflammatoire, par effet suppresseur sur les médiateurs de l'inflammation et de l'allergie (IL1, IL6, α TNF, PGE₂), à l'exclusion d'une action sur la mélanogénèse.

Les conjugués dont les séquences en position 4 possèdent l'acide D-homo-phényle (dérivés peptidiques 1 à 4 et 9 à 17), sont particulièrement orientés vers des activités de stimulation des processus de mélanogénèse, et possèdent également une activité anti-allergique et anti-inflammatoire.

Les séquences peptidiques selon la présente invention peuvent être obtenues par l'un des procédés quelconque connus de l'homme de métier, notamment par des procédés de synthèse chimique dans laquelle on peut intégrer les différents acides. En tout état de cause compte tenu de la faible dimension des peptides, la synthèse chimique est tout à fait possible et permet d'obtenir des produits très purs.

D'autres caractéristiques des conjugués selon l'invention apparaîtront à la lumière des exemples ci-après, qui illustrent également leur procédé de préparation par synthèse chimique.

Exemple 1 : Synthèse du conjugué 1 - A = Acide Adipique

Adipoyl - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂.

La synthèse a été réalisée par la méthode de Merrifield en phase solide en utilisant une résine MBHA, et comme groupement protecteur FMOC

- 5 (fluoroényl méthoxy carbonyl).

Les dérivés d'acides aminés utilisés sont les suivants :

FMOC - Gly - OH,

FMOC - Trp - OH,

FMOC - Arg (Tos) - OH,

- 10 FMOC - D-homo-Phé - OH,

FMOC - His (Trt) - OH,

FMOC - Glu (chex) - OH, et

FMOC - Me.Nle - OH,

que l'on couple en utilisant le BOP comme agent de couplage.

- 15 Chaque acide aminé est utilisé en excès (x2) ainsi que le BOP (x2) et chaque couplage est répété 2 fois.

L'acide adipique est couplé de façon similaire, le groupement FMOC étant éliminé à chaque étape par la pipéridine (20 % dans le diméthylformamide). La déprotection finale est effectuée en deux étapes :

- 20 a) acide trifluoroacétique (2 fois x 5 minutes)

b) acide fluorhydrique anhydre / p-crésol 95,5 (45 minutes).

Le composé brut obtenu avec un rendement de 78 % est repris dans un mélange eau/acide acétique 95,5 % et est ensuite lyophilisé.

- 25 Le composé P1 obtenu a une pureté de 82 % (HPLC). 100 mg de ce composé sont ensuite purifiés par HPLC en utilisant une colonne C18 et on obtient 65 mg de produit pur.

Temps de rétention = 17,04 minutes dans les conditions suivantes :

- colonne C8 (250 mm x 5 mm), détection UV 210 nm

- 30 - solvant tampon phosphate Triéthylamine - acétonitrile 10 - 60 % en 15 minutes ; débit 1,4 ml /minute.

Analyse des acides aminés

Glu 1,02 - Gly 1,01 - His 1,00 - Arg 0,94 - D-homo-Phé 1,03 - (le Tryptophane n'a pas été déterminé car il se dégrade lors de l'hydrolyse acide).

Spectre de masse (FAB +) 1018,4 / 1126,5

Exemple 2 : Synthèse du conjugué 5 - A = Acide Adipique

En reprenant le mode opératoire de l'exemple 1 et en remplaçant Fmoc-D-homo-Ph-OH par Fmoc-para-fluoro-Phé-OH, on obtient le composé P2 :

- 5 Adipoyl - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂.

F = 120°C, décomposition. (α)_D - 7 (c = 0,4 DMF). HPLC : colonne C₁₈, 5 μ m, débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0,1 % / acétonitrile 77/23 v/v, temps de rétention 30,45 min. ¹H RMN (DMSO-d₆) ppm : Me.Nle (4,76, 1,62, 1,24, 0,82) ; Glu (8,54, 4,32, 1,86-1,72, 2,24) ; His (8,09, 4,53, 2,95-2,82) ; Para-Fluoro-Phé (8,09, 4,53, 3,00-2,78, 7,3-7,0) ; Arg (8,36, 4,29, 1,54-1,68, 1,45, 3,07) ; Trp (8,07, 4,53, 3,16-3,01, 10,80, 7,19, 7,56, 7,30, 6,96) ; Gly (8,18, 3-67-3,54).

15 Exemple 3 : Synthèse du conjugué 1 - A - Acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque

En opérant comme dans l'exemple 1, en remplaçant l'acide adipique par l'acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque, on obtient le composé P3 :

- trans-10-hydroxy-2-décénoyle - Me.Nle - Glu - His - D-Homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂.

20 F = 115°C, décomposition. (α)_D - 16 (c = 0,3 DMF). HPLC : colonne C₁₈, 5 μ m, débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0,1 % / acétonitrile 71/29 v/v, temps de rétention 24,20 min. ¹H RMN (DMSO-d₆) ppm : Ac (1,84) ; Me.Nle (8,00, 4,15, 1,59-1,48, 1,23, 0,83) ; Glu (8,00, 4,15, 1,86-1,72, 2,19) ; His (8,00, 4,54, 3,00-2,88, 8,89, 7,26) ; D-Homo-Phé (7,98, 4,53, 2,99-2,78, 7,3-7,0) ; Arg (8,27, 4,29, 1,67-1,53, 1,46, 3,08) ; Trp (8,07, 4,54, 3,16-3,01, 10,80, 7,16, 7,56, 7,30, 7,04, 6,96) ; Gly (8,19, 3,68-3,54).

Exemple 4 : Synthèse du conjugué 2 - A = Acide α -Amino-Adipique

- 30 En opérant comme dans l'exemple 1, en remplaçant l'acide adipique par l'acide α -amino-adipique, on obtient le composé P4 :

α -amino-adipoyl - Me.Nle - Glu - His - D-Homo-Phé - Arg - Trp - NH₂.

F = 130°C, décomposition. (α)_D - 5 (c = 0,5 DMF). HPLC : colonne C₁₈, 5 μ m, débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0,1 % /

acétonitrile 77/23 v/v, temps de rétention 28,80 min. ^1H RMN (DMSO- d_6) ppm : Me.Nle (3,77, 1,62, 1,24, 0,82) ; Glu (8,53, 4,32, 1,82-1,71, 2,25) ; His (8,11, 4,53, 2,98-2,83) ; D-Homo-Phé (8,06, 4,47, 2,99-2,77, 7,25-7,1) ; Arg (8,32, 4,30, 1,69-1,55, 1,45, 3,07) ; Trp (8,02, 4,59, 3,16-3,00, 10,78, 7,15, 7,58, 7,30, 7,04, 6,96).

5

Exemple 5 : Synthèse du conjugué 3 - A = Acide Sébacique

En reprenant le mode opératoire de l'exemple 1, sans les réactifs FMOC - Gly - OH et FMOC - Trp - OH, en remplaçant l'acide adipique par l'acide sébacique, on obtient le composé **P5** :

10 Sébaçoyle - Me.Nle - Glu - His - D-Homo-Phé - Arg - NH_2 .

F = 130°C, décomposition. (α) $_D$ - 3,2 (c = 0,5 DMF). HPLC : colonne C₁₈, 5 μm , débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0,1 % / acétonitrile 77/23 v/v, temps de rétention 21,86 min. ^1H RMN (DMSO- d_6) ppm : Me.Nle (4,70, 1,80, 2,30, 1,95) ; Glu (8,57, 4,30, 1,82-1,71, 2,25) ; His (8,21, 4,55, 2,98-2,83) ; Phé (8,09, 4,55, 2,99-2,77, 7,25-7,1) ; Arg (8,31, 4,30, 1,69-1,55, 1,45, 3,07) ; Trp (7,95, 4,61, 3,16-3,00, 10,78, 7,15, 7,58, 7,30, 7,04, 6,96) ; Gly (8,32, 3,75).

15

Exemple 6 : Etude de l'activité Anti-allergique des conjugués peptidiques, par le test d'Hyper-sensibilité de contact au Dinitro-fluorobenzène (DNFB).

20

Matériel et méthode

Des souris femelles C57 BL/6JICO, âgées de 5 semaines sont réparties en dix lots de dix animaux (cinq par cage), avec libre accès à l'eau et à la nourriture, soumises à une photopériode de douze heures de lumière par vingt-quatre heures.

25

Les animaux des lots 1 à 6 reçoivent quotidiennement et par application topique sur la peau rasée du dos, les produits à étudier (conjugués 1 et 5 représentés par les composés **P1** et **P2** préparés selon les exemples 1 et 2), mis en solution dans du propylène glycol, sous un volume constant de 50 μl et cela pendant cinq jours consécutifs.

30

Posologie par souris et par jour

Composé **P1** - Lots 1, 2 et 3 - 2,5 μg , 0,5 μg et 0,1 μg /souris/jour respectivement.

35

Composé P2 - Lots 4, 5 et 6 - 2,5 µg, 0,5 µg et 0,1 µg /souris/jour respectivement.

Les animaux du lot 10 servent de témoins (ils reçoivent seulement, 50 µl de propylène glycol par application topique pendant cinq jours).

Au cinquième jour, trente minutes après la dernière application toutes les souris sont sensibilisées avec 25 µl de D N F B (2,4-dinitro-1-fluorobenzène (FLUKA CHEMIKA PURUM à 97 % lot n° 33820890)) à 2 % dans un mélange 4 pour 1 d'acétone (SDS réf 0510) et de trioléine (FLUKA) appliqué par voie topique sur la région dorsale de peau rasée.

Au sixième jour, on procède à une nouvelle sensibilisation par application de D N F B.

Au onzième jour, l'épaisseur des oreilles des souris, est mesurée à l'aide d'un micromètre (ROCH 0 à 25 mm au 1/100 mm) afin d'obtenir des valeurs de base, puis les oreilles sont stimulées par application topique de 20 µl de D N F B à 0,8 %.

Au douzième jour, l'épaisseur des oreilles est à nouveau mesurée. On établit la valeur moyenne de l'épaississement des oreilles pour les souris des lots qui ont reçu les produits à étudier, ainsi que pour les souris du lot témoin.

Le pourcentage de suppression éventuelle sera exprimé par le calcul suivant :

$$\frac{T - E}{T} \times 100$$

avec T pour le pourcentage d'augmentation de l'épaisseur moyenne des oreilles du lot témoin et E pour celui des lots qui ont reçu les produits à étudier.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau I ci-après.

TABLEAU 1

| 5 | Conj. | Lot | % Augment. O. Gauche | % Augment. O. Droite | % Suppress. O. Gauche | % Suppress. O. Droite |
|----|-------|-----|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 1 | 1 | 17,50 | 17,80 | 69,80 | 69,57 |
| | 1 | 2 | 19,00 | 19,50 | 67,24 | 66,66 |
| | 1 | 3 | 21,50 | 22,00 | 62,93 | 62,39 |
| 10 | - | T | 58 | 58,50 | - | - |
| | 5 | 4 | 17 | 16,65 | 70,48 | 71,39 |
| | 5 | 5 | 18,60 | 19,00 | 67,70 | 67,35 |
| | 5 | 6 | 20,80 | 21,50 | 63,88 | 63,05 |
| | - | T | 57,60 | 58,20 | - | - |

15

T représente les Lots témoins pour chaque conjugué étudié.

Les conjugués 1 et 5 suppriment de façon hautement significative, de l'ordre de 69 % et 71 %, la réaction d'hypersensibilité cutanée induite par administration de D N F B dans les conditions expérimentales décrites précédemment.

20

Exemple 7 : Etude de l'activité anti-inflammatoire des conjugués 1 et 5 (composés P1 et P2)

25

But de l'étude :

Mise en évidence de l'effet inhibiteur des conjugués 1 et 5 (composés P1 et P2) sur la production par des fibroblastes stimulés par l'IL 1, d'un métabolite de l'acide arachidonique, la PGE2.

30

Méthodes :

1 - Culture de fibroblastes pulmonaires embryonnaires d'origine humaine :

Nous avons choisi d'utiliser la souche ATCC MRC5 entretenue au laboratoire de façon continue et déjà testée par Cannon et al. (J. Immunol., 1986). Après un repiquage, les fibroblastes sont cultivés dans des micropuits (plaque de 24 puits de 2 cm², Falcon). L'innoculum est de 30 000 cellules par puits ; le milieu nutritif utilisé est composé de RPMI 1640 (90 %) et de sérum

35

de veau foetal décomplémenté (SVF, 10 %). Le milieu est changé tous les deux jours jusqu'à confluence des cellules.

2 - Mise en expérience :

- Les couches monocellulaires ainsi obtenues sont lavées puis
- 5 préincubées pendant 24 heures dans du milieu frais ne contenant que 1 % de SVF. Les substances à tester sont ajoutées au milieu à différentes concentrations comprises entre 10^{-6} et 10^{-4} M. Après 20 minutes d'incubation en présence de ces composés, l'IL1 recombinante humaine (Tebu, France) à la
- 10 concentration de 5, 2,5 ou 0,5 ng/ml de milieu est mise en contact avec des cellules pendant 18 heures. A la fin de cette incubation les surnageants sont prélevés et congelés à -80°C jusqu'à l'analyse. Les couches monocellulaires sont fixées au méthanol.

3 - Dosage de PGE2 :

- Le dosage RIA est effectué selon la méthode décrite par Dray et al.
- 15 (Europ. J. Invest. 1975). 3 séries d'expériences en duplicate ont été réalisées pour chaque concentration de produit étudié et pour les contrôles. Les résultats sont exprimés en pg/ μg d'ADN. L'effet inhibiteur est exprimé en pourcentage par rapport aux contrôles.

- Afin d'éviter toute erreur possible due au comptage en microscopie
- 20 optique, l'ADN a été dosé par méthode fluorimétrique selon le protocole décrit par Brunk et al. (Analytical Biochem., 1979).

Les tableaux 2 et 3 ci-après rassemblent une première série d'essais sur la souche MRC5.

TABLEAU 2
Action du Conjugué 1

| | Concentration IL1 (ng) | Concentration Conjugué 1 (M) | PGE2 pg/mg d'ADN | % inhib. |
|----|---------------------------|---------------------------------|---------------------|----------|
| 5 | | 0 | 389 ± 60 | - |
| | | 10 ⁻⁴ | 179 ± 50 | 53 |
| | | 10 ⁻⁵ | 232 ± 45 | 40 |
| | 2,5 | 10 ⁻⁶ | 292 ± 68 | 24 |
| 10 | | 10 ⁻⁷ | 364 ± 68 | 6 |
| | | 10 ⁻⁸ | 335 ± 50 | 13 |
| | | 10 ⁻⁹ | 320 ± 43 | 17 |
| | | 0 | 288 ± 25 | - |
| | 0,5 | 10 ⁻⁴ | 113 ± 25 | 60 |
| 15 | | 10 ⁻⁵ | 176 ± 37 | 38 |
| | | 10 ⁻⁶ | 231 ± 55 | 19 |
| | | 10 ⁻⁷ | 249 ± 60 | 13 |
| | | 10 ⁻⁸ | 258 ± 35 | 10 |
| 20 | | 10 ⁻⁹ | 364 ± 56 | - |

Les résultats montrent une bonne action inhibitrice du conjugué 1 avec un rapport effet dose. Cette action ne dépend pas de la concentration en IL1. On n'observe pas d'action à partir de 10⁻⁷ M dans les deux cas.

TABLEAU 3
Action du Conjugué 5

| | Concentration IL1 (ng) | Concentration Conjugué 5 (M) | PGE2 pg/mg d'ADN | % inhib. |
|----|---------------------------|---------------------------------|---------------------|----------|
| 5 | | 0 | 7576 ± 310 | - |
| | | 10 ⁻⁴ | 2964 ± 184 | 60 |
| | | 10 ⁻⁵ | 4580 ± 230 | 38 |
| | 5 | 10 ⁻⁶ | 4900 ± 340 | 34 |
| 10 | | 10 ⁻⁷ | 6150 ± 365 | 17 |
| | | 10 ⁻⁸ | 6142 ± 255 | 17 |
| | | 10 ⁻⁹ | 5047 ± 279 | 32 |

Les conjugués 1 et 5 possèdent un pouvoir inhibiteur de l'action de l'IL1 et de la PGE2. Très significative cette action pourrait être liée à un blocage des récepteurs.

Exemple 8 : Etude de l'action des conjugués 1 et 5 sur la mélanogénèse de la souris après l'application topique sous forme de crème dermique (Technique de Warren*)

Matériel et méthode

1) Matériel

- Excipient dermique N° 66
- 25 Lano - vaseline - Ac,
Huile de vaseline Pharmacopée,
Cire d'abeille Ethoxyle,
Lanoline purifiée,
PEG - 200.
- 30 - Formules dermiques
Conjugués 1 et 5 (représentés par les composés P1 et P2) incorporés à raison de 10 x 10⁻⁵ M dans l'excipient dermique N° 66.
- Animaux
Souris DBA/2 IFFA - CREDO âgées de 5 semaines.
- 35 2) Méthodes (Raphael WARREN PhD & coll. 0022-202, 1987, Society for Investigate Dermatology).

- On délimite sur chaque animal une tonsure dorsale après épilation.
- Les produits à essayer sont appliqués par massage à raison de 2 applications par jour, de 50 µl de chaque préparation pendant 5 jours.
- Deux jours après la dernière application, on sacrifie les animaux et on prélève des fractions de 50 mg environ de peau traitée.
- 5 • Chaque prélèvement est desséché par lyophilisation et pesé.
- Les fragments de peau sont ensuite soumis à une hydrolyse enzymatique par la protéase K pendant 72 heures à 45°C (Protéase K Merck - 24.568).
- 10 • On ajoute aux hydrolysats obtenus 500 µl de Na_2CO_3 et 20 µl de H_2O_2 à 35 %.
- On met à incuber 30 minutes à 80°C.
- Après refroidissement on ajoute à chaque échantillon 200 µl de chloroforme / méthanol (2 vol/1 vol).
- 15 • On centrifuge à 10 000 g.
- On répartit la phase aqueuse (200 µl) dans les puits d'une microplaque "NUNC".
- Dosage de la Mélanine
- Le dosage de la mélanine s'effectue à 405 nm à l'aide d'un Multiskan -
- 20 Titertek - MCC - 340, comparativement à une gamme étalon de mélanine Sigma M. 8631.
- Résultats
- Ils sont exprimés en pourcentage de mélanine comparativement aux excipients considérés comme témoins.
- 25 I - Crème 1 - 5 10^{-5} M de conjugué 1 pour 50 µl de crème.
- II - Crème 5 - 5 10^{-5} M de conjugué 5 pour 50 µl de crème.
- III - Excipient 66 - comme témoin T.

Les moyennes des résultats sur 15 dosages sont reportés sur le Tableau 4 ci-dessous.

TABEAU 4

| Echantillon | % Mélanine / témoin |
|-------------|---------------------|
| I | 80 % |
| II | 12 % |
| 35 III | 5 % |

Le pourcentage de stimulation est calculé en fonction des valeurs QE et QT, avec QE pour la quantité moyenne de mélanine par mg de peau de l'échantillon testé et QT pour la quantité moyenne de mélanine par mg de peau du témoin, selon la formule

$$\% \text{ de stimulation} = \frac{QE - QT}{QT} \times 100$$

La crème dermique 1 administrée par voie topique, induit de façon hautement significative la synthèse de la Mélanine au niveau de l'épiderme (+ 75 %). Cette activité conforme à l'objet de la présente invention est liée à la structure chimique du conjugué 1 qui contient le groupement D-homo-Phé.

Par contre, la crème dermique 5 administrée par voie topique, n'a pas d'activité sur la stimulation de la mélanogénèse épidermique, cette absence d'activité est liée à la présence dans le conjugué 5 du groupement para-fluoro-Phé.

Ces résultats ont été confirmés par une étude sur la mélanogénèse selon la technique dite de "CLOUDMAN" par culture de mélanocytes in vitro, en utilisant les cellules du mélanome de CLOUDMAN chez le rat.

L'ensemble des résultats obtenus sont conformes à l'objet de la présente invention dont l'objectif est la réalisation de conjugués actifs par voie topique et dont les activités anti allergiques et anti inflammatoires peuvent être séparées de l'activité sur la mélanogénèse selon les applications envisagées.

Exemple 9 : Etude comparative de l'activité des conjugués et de leurs structures peptidiques, sur l'hypersensibilité de contact au D N F B.

Matériel et méthode

La méthode utilisée est celle décrite précédemment dans l'exemple N° 4, hypersensibilité de contact induite chez la souris par la D N F B.

- Produits étudiés

Lot I : trans-10-hydroxy-2-décénol - Me-Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂

35 - Conjugué 1 représenté par le composé P3.

Lot II : Me-Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂

Lot T : Témoin = Acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque.

Solvant : le propylène glycol précédemment employé comme témoin dans l'exemple 6.

Une mesure de l'activité du témoin sera effectuée pour chaque expérimentation.

5

- Expérimentation et posologie

| | | |
|----|--|---|
| 10 | <p>Lot I : Doses utilisées</p> <p>1 = 0,1 $\mu\text{g/souris/jour}$</p> <p>2 = 0,5 $\mu\text{g/souris/jour}$</p> <p>3 = 2,5 $\mu\text{g/souris/jour}$</p> | <p>Lot II : Doses utilisées</p> <p>4 = 0,1 $\mu\text{g/souris/jour}$</p> <p>5 = 0,5 $\mu\text{g/souris/jour}$</p> <p>6 = 2,5 $\mu\text{g/souris/jour}$</p> |
|----|--|---|

Témoin : 10 ng d'acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque par souris et par jour.

- 15 Au cinquième jour, trente minutes après la dernière application toutes les souris sont sensibilisées avec 25 μl de D N F B (2,4-dinitro-1-fluorobenzène (FLUKA CHEMIKA PURUM à 97 % lot N° 33820890)) à 2 % dans un mélange 4 pour 1 d'acétone (SDS réf. 05510) et de trioléine (FLUKA) appliqué par voie topique sur la région dorsale de peau rasée. Au sixième
- 20 jour, on procède à une nouvelle sensibilisation par application de D N F B. Au onzième jour, l'épaisseur des oreilles des souris, est mesurée à l'aide d'un micromètre (ROCH 0 à 25 mm au 1/100 mm) afin d'obtenir des valeurs de base, puis les oreilles sont stimulées par application topique de 20 μl de D N F B à 0,8 %. Au douzième jour, l'épaisseur des oreilles est à nouveau mesurée. On
- 25 établit la valeur moyenne de l'épaississement des oreilles pour les souris des lots qui ont reçu les produits à étudier, ainsi que pour les souris du lot témoin. Le pourcentage de suppression éventuelle sera exprimé par la même équation que dans l'exemple 6.

Les résultats sont reportés dans le Tableau 5 ci-après.

30

TABLEAU 5

| 5 | Lot | Dose* | % | % | % | % |
|----|-----|-------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| | | | Augment. O. Gauche | Augment. O. Droite | Suppress. O. Gauche | Suppress. O. Droite |
| | I | 2,5 | 11,00 | 11,40 | 80,28 | 79,64 |
| | I | 0,5 | 13,00 | 12,90 | 76,70 | 76,96 |
| | I | 0,1 | 15,60 | 14,60 | 72,04 | 73,92 |
| | T | 0,01 | 55,80 | 56,00 | - | - |
| 10 | II | 2,5 | 17,60 | 18,50 | 69,17 | 67,82 |
| | II | 0,5 | 24,00 | 22,80 | 57,96 | 60,34 |
| | II | 0,1 | 32,00 | 30,20 | 43,95 | 47,47 |
| | T | 0,01 | 57,10 | 57,50 | - | - |

* µg/souris/jour.

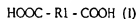
- 15 On observe 80 % de suppression de l'hypersensibilité cutanée à la dose de 2,5 µg/souris/jour pour le conjugué 1 (composé P3) selon l'invention, et une nette relation doses/effets entre les doses de 0,1, 0,5 et 2,5 µg/souris/jour. Par contre, pour le peptide seul, on observe 47 % de suppression de l'hypersensibilité cutanée à la dose de 0,1 µg/souris/jour et, pour les
- 20 doses de 0,5 µg et de 2,5 µg, la réponse suppressive est de l'ordre de 60 et 69 %. Enfin, on n'observe pas d'effet suppressif de l'hypersensibilité cutanée par administration de l'acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque, en solution dans le propylène - glycol.

- Administrés par voie topique et dans les conditions expérimentales
- 25 décrites, le conjugué 1 selon l'invention induit de façon hautement significative la suppression de l'hypersensibilité cutanée chez la souris.

REVENDICATIONS

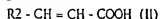
1 - Conjugué peptidique, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence peptidique comprenant au moins une séquence de 4 acides aminés dérivés de l' α MSH, les acides aminés étant sous forme naturelle ou non, ladite séquence étant conjuguée, chimiquement ou physiquement avec des acides sélectionnés parmi :

- les acides di-carboxyliques de formule générale I



10 dans laquelle R1 représente un radical alkylène, linéaire ou ramifié, comprenant au moins 3 atomes de carbone, de préférence de 3 à 10 atomes de carbone, éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino ou hydroxy, et

- les acides gras α -monoinsaturés de configuration cis ou trans, de préférence trans, de formule générale II



dans laquelle R2 représente un radical alkyle, linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence de 6 à 10 atomes de carbone, substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo.

20 2 - Conjugué selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence d'acides aminés est liée à l'acide sélectionné sous forme de sel, d'ester ou d'amide.

3 - Conjugué selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les acides de formules générales I ou II sont de préférence choisis

25 parmi les diacides carboxyliques de formule I pour lesquels R1 représente un reste alkylène en C_4 - C_8 , substitué ou non, en particulier les acides α -adipiques, α -amino-adipiques et dérivés, l'acide sébacique et dérivés, les acides gras α -monoinsaturés de formule II pour lesquels R2 représente un reste alkyle, linéaire ou ramifié en C_7 , en particulier les acides hydroxydécénoïques, et décénoïques, sous forme des sels, esters, ou amides correspondants.

4 - Conjugué selon la revendication 3, caractérisé en ce que les acides de formules générales I ou II sont de préférence choisis parmi l'acide adipique, l'acide α -amino adipique, l'acide sébacique, l'acide trans - 10 - hydroxy - Δ^2 - décénoïque et l'acide trans-oxo - 9 - décène - 2 - oïque.

35

5 - Conjugué selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence peptidique comporte au moins l'une des séquences suivantes :

- Glu - His - Phé -

- His - Phé - Arg -

- Glu - His - Phé - Arg -

dans laquelle Phé représente la phénylalanine ou un dérivé halogéné de la phénylalanine notamment D-homo-Phé et parafluoro-Phé, les acides aminés pouvant être sous forme D, L ou D,L.

10 6 - Conjugué selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il s'agit de conjugués de formule générale III :

A - X - Glu - His - Phe - Y (III)

dans laquelle

15 A est un acide de formules générales I ou II telles que définies dans les revendications 1, 3 et 4,

X représente un groupe 5-Me.Norleucine (Me.Nle), 2-N-Me.Norceuline (N-Me.Nle), OH ou NH₂.

Y représente un reste Arg - Z ou Z dans lequel Z est Trp - Gly - OH, Trp - OH, OH, Trp - Gly - NH₂, Trp - NH₂, ou NH₂,

20 Phé représente un reste D-Homo-Phé ou para-fluoro-Phé, les acides aminés étant sous forme D, L ou D,L.

7 - Conjugué selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les dérivés peptidiques suivants :

1 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂

25 2 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - NH₂

3 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - NH₂

4 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - NH₂

5 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂

6 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - NH₂

30 7 A - Me.Nle - Glu - His - para-Fluoro-Phé - Arg - NH₂

8 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - NH₂

9 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂

10 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé- Arg - Trp - NH₂

11 A - N - Me.Nlc - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - NH₂

35 12 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - NH₂

13 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - OH

14 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - OH

- 15 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - OH
 - 16 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
 - 17 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - OH
 - 18 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
 - 5 19 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - OH
 - 20 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - OH
 - 21 A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
 - 22 A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - OH
- A étant un acide de formules générales I ou II telles que définies dans les revendications 1, 3 et 4, ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels d'esters ou d'amides.
- 8 - A titre de médicaments, les conjugués selon l'une des revendications 1 à 7.
- 9 - Médicament selon la revendication 8, utile pour le traitement
- 15 des allergies notamment cutanées, des réactions inflammatoires et des troubles de la mélanogénèse, utilisable en médecine humaine et vétérinaire.
- 10 - Composition galénique, caractérisée en ce qu'elle comprend un conjugué selon l'une des revendications 1 à 7.
- 11 - Composition galénique selon la revendications 10, caractérisée
- 20 en ce qu'il s'agit de préparations dermo-cosmétologiques sous forme de solutions, de lotions d'émulsions, ou de crèmes utilisées comme accélérateur de bronzage de la peau, sans exposition aux U.V.
- 12 - Composition galénique selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisée en ce qu'il s'agit de préparations galéniques, sous forme de
- 25 solutions, de lotions, de crème, de spray.

RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche2735131
N° d'enregistrement
nationalFA 515094
FR 9506909

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|--|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| X | FR-A-2 691 465 (PF MEDICAMENT) 26 Novembre 1993 * page 3, ligne 13 - page 4, ligne 9; revendications 1,5,8,9 * | 1-3,5, 8-12 |
| X | EP-A-0 389 950 (LION CORP) 3 Octobre 1990 * page 2, ligne 48 - page 3, ligne 6; revendications * | 1,2,8-12 |
| X | BIOCHEMISTRY, vol. 32, no. 45, 16 Novembre 1993 pages 12264-12272, XP 000403772 ITO A S ET AL 'STRUCTURE-ACTIVITY CORRELATIONS OF MELANOTROPIC PEPTIDES IN MODEL LIPIDS BY TRYPTOPHAN FLUORESCENCE STUDIES' * page 12265, colonne de gauche, alinéa 4 * | 1 |
| A | WO-A-95 08564 (INST EUROP DE BIOLOG CELLULAIRE; DUSSOURD D HINTERLAND LUCIEN (FR)); 30 Mars 1995 * page 1, ligne 12 - ligne 21; revendications; exemples * | 1-12 |
| A | EP-A-0 517 211 (TEIKOKU SEIYAKU KK) 9 Décembre 1992 * page 3, ligne 6 - ligne 10 * * page 3, ligne 29 - ligne 36; revendications 1,2,6 * | 1-12 |
| | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (art. CL 6) |
| | | C07K A61K |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur |
| 7 Mars 1996 | | Fuhr, C |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES | | |
| <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un motif une revendication ou arrière-plan technologique général D : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt ou qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>à : membre de la même famille, document correspondant</p> | | |

(19) French Republic (11) Publication Number: 2 735 131
(Use only for ordering of copies)
(21) National Registration Number: 95 06909

National Institute for Industrial Property

PARIS (51) Int. Cl.⁵: C 07 K 5/107, 7/06, A 61 K, 38/07, 38/08, 7/40

(12) PATENT APPLICATION A1

(22) Filing Date: 06.12.95

(30) Priority:

(43) Date of public disclosure of the application: 12.13.96, Bulletin 96/50.

(56) List of documents cited in the research report: listed at the end of the present section.

(60) References to other related national documents:

(71) Applicant(s): SOCIETE D'ETUDE ET DE RECHERCHE DE PATHOLOGIE
APPLIQUE SERPA SOCIETE CIVILE, FRANCE.

(72) Inventor(s): Lucien Dussourd d'Hinterland and Anne-Marie Pinel.

(73) Owner(s):

(74) Representative: REGIMBEAU.

(54) Conjugates of α MSH with a fatty acid, method to prepare them and their use as a drug.

(57) The present invention relates to a peptide conjugate, characterized in that it includes a peptide sequence comprising at least one sequence of four amino acids derived from α MSH, whether said acids are in a natural form or not, said sequence being chemically or physically conjugated with acids selected from:

- di-carboxylic acids according to General Formula I:
 $\text{HOOC} - \text{R1} - \text{COOH}$ (I)

wherein R1 is a straight or branched alkylene radical having at least 3 carbon atoms, and preferably from 3 to 10 carbon atoms, being eventually substituted, in particular by one or more amino or hydroxy groups, and

- α -monounsaturated fatty acids with a cis, or preferably trans configuration according to General Formula II:



wherein R2 is a an alkyl radical, straight or branched, comprising at least 6 carbon atoms, preferably 6 to 10 carbon atoms, substituted by an amino, hydroxy or oxo group.

[page 1 of Specifications]

The purpose of the present invention is to realize derivatives of peptide homologs of α MSH or melanotropin, obtained by chemical synthesis, in the form of lipo-peptides.

α MSH and its homologs are the subject of many publication, even of therapeutical tests, but this has not led to realization of a medication yet. The main reason for this is the extreme ubiquity of α MSH in the function of administered doses and paths of administration.

Moreover, the absence of a relationship between the doses and effects (which is the case of many peptides hormones) seriously complicates its therapeutical use. In fact, since cellular receptors of MSH and its homologs are of the type G and intracellular transduction is performed according to cyclic AMP, activation of cellular receptors is obviously inversely proportional to the doses of peptide hormones accepted by the structures of membrane receptors.

The present invention is based on research of peptide structures oriented specifically toward antiallergic and antiinflammatory activities on the one hand, and toward activators of melanogenesis on the other hand, to the exclusion of all other pharmacological effects, in particular in the central nervous system, as well as peripheral nervous system.

More specifically, the present invention concerns a conjugate including a peptide sequence comprising at least one sequence of 4 amino acids derived from α MSH, whether the amino acids are in a natural form or not, said sequence being conjugated, chemically or physically with acids of known metabolic activities, selected from:

- di-carboxylic acids according to General Formula I:
 $HOOC - R1 - COOH \quad (I)$

wherein R1 is a straight or branched alkylene radical having at least 3 carbon atoms, and preferably from 3 to 10 carbon atoms, being eventually substituted, in particular by one or more amino or hydroxy groups, and

- α -monounsaturated fatty acids according to General Formula II:
 $R2 - CH = CH - COOH \quad (II)$

[page 2]

wherein R2 is a an alkyl radical, straight or branched, comprising at least 6 carbon atoms, preferably 6 to 10 carbon atoms, substituted by an amino, hydroxy or oxo group, said acids having a cis or trans configuration, preferably trans.

The sequence of α MSH is as follows:

N-acetyl-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

Whenever sequences originating in α MSH are mentioned in the following text, it should be understood that the amino acids can be in the form of D, L, or D, L, or in natural or non-natural forms of acids corresponding to derivatives, in particular substituted, for example halogenated.

The conjugated peptides having the molecular weight according to this invention are with advantage linked in the form of salts, esters or amides to acids having metabolic functions that are essential for activation of the tricarboxylic cellular cycle, such as those described above.

The acids according to General Formula I or II are preferably selected from carboxylic diacids, wherein R1 represents an alkylene radical in C₄-C₈, substituted or not substituted, in particular adipic acids and derivatives, sebacic acids and derivatives, fatty α -monounsaturated acids wherein R2 represents an alkyl radical, straight or branched in C₇, in particular hydroxydecanoic acids and decenoylic acids in the form of corresponding salts, esters or amides.

This will be preferably adipic acid or "hexanedioic acid" (ADIP), α -amino adipic acid (2-amino hexanedioic), sebacic acid or decanedioic, trans-10-hydroxy- Δ^2 -decanoic acid or trans-hydroxy-10-decene-2-oic acid (AH), and trans-oxo-9-decene-2-oic acid (9-ADO).

Preferable among these acids are in particular fatty acids below, more particularly those that have been adapted in order to obtain peptide liposoluble derivatives, sebacic acid and derivatives thereof, oxo-decanoic acid, and trans-hydroxy-decanoic acid, defined above, whose biologic activities are linked to their properties, antiandrogenic, antiseborrheic and lyptic acids (Madea at al., Nippon, Hifuka - 98 (4), p. 469 - 1988).

[page 3]

More specifically, the present invention concerns peptides that are activators of melanogenesis, antiallergic and antiinflammatory.

The sequence of 4 amino acids originating in α MSH, and conjugates according to this invention, comprises preferably at least one of the following peptide sequences:

- Glu - His - Phe -
- His - Phe - Arg -
- Glu - His - Phe - Arg -

wherein Phe is phenylalanine or a halogenated derivative of phenylalanine, in particular D-homo-Phe and parafluoro-Phe amino acids which can be in the form D, L or D, L.

In an advantageous manner, the conjugates according to the invention correspond to General Formula III:

A - X - Glu - His - Phe - Y (III)

in this formula:

A represents an acid according to General Formula I or II or such as defined above, in particular adipic acid, or α -amino adipic acid, sebacic acid, trans-oxo-9-decene-2-oic acid or trans-hydroxy-10-decene-2-oic acid,

X represents the group 5-Me.Norleucin (Me.Nle), 2-N-Me-Norleucine (N-Me.Nle), OH or NH₂,

Y represents an Ar - Z or Z radical, in which Z is Trp - Gly - OH, Trp - OH, OH, Trp - Gly - NH₂, Trp - NH₂, or NH₂,

Phe represents a D-Homo-Phe radical or para-fluoro-Phe radical, the amino acids being the form D, L or D, L.

The present invention relates in particular to the following peptide derivatives:

- 1 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - Gly - NH₂
- 2 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - NH₂
- 3 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - NH₂
- 4 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - NH₂
- 5 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - NH₂
- 6 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - Trp - NH₂
- 7 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - NH₂

[page 4]

- 8 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - NH₂
- 9 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe-Arg-Trp-Gly - NH₂
- 10 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo -Phe- Arg - Trp - NH₂
- 11 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - NH₂
- 12 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - NH₂
- 13 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - Gly - OH
- 14 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - OH
- 15 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - OH
- 16 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - Gly - OH
- 17 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - OH
- 18 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - Trop - Gly - OH
- 19 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - Trp - OH
- 20 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - trp - Gly - OH
- 21 A - N - Mle.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - Trp - Gly - OH
- 22 A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - Trp - OH

wherein A is as defined above, as well as derivatives of these molecules in the form of salts of esters or amines.

In the conjugates above from 1 through 22, the position of the acid A corresponds to a derivative ester or amide, being the acid carboxylic fraction of an acid ensuring linking.

The sequences of amino acids mentioned above can be sequences of natural amino acids or sequences of non-natural amino acids. In the same way, in some cases it is possible that some of these acids contain functions such as glycolysation. It should be understood that the present invention relates in the same manner to a totality of these forms comprised in the present invention.

The present invention relates in the same manner to medications containing one or several conjugates according to this invention.

The present invention relates in the same manner to the use of these compounds in the cosmetic domain.

The present invention relates in the same manner to galenic compositions, as well as pharmaceutical, dermo-cosmetic and cosmetic compositions comprising one compound such as defined above.

The compositions can be in one of the forms known in the cosmetic domains, while the topical and parenteral forms are preferred.

These compositions can be used both in the human and in the veterinary domain.

One of the objects of the present inventions is the application by topical and parenteral path of the above mentioned peptide conjugates. These pharmaceutical conjugates can be in a form that can be administered by oral or parenteral path, in particular injectable, but preferably in a form that can be administered by an external topical path.

These compositions can be in particular in the form of a cream, spray, or lotion, for example including known excipients or other active ingredients. It is advantageous when dermo-cosmetologic preparations are in the form of solutions, emulsion lotions, or cremes that are used as accelerators for tanning of skin, without being exposed to ultraviolet rays.

The compositions according to the present invention are useful in particular for prevention and treatment of allergies, especially cutaneous, inflammatory reactions, and melanogenesis disorders.

The conjugates whose peptide sequence has in position 4 a para-fluoro-Phe amino acid (peptide derivatives 5 through 8 and 18 through 22) are in particular oriented toward a biologic anti-allergic activity and antiinflammatory activity (IL1, IL6, α TNF, PGE₂), to the exclusion of an effect on melanogenesis.

The conjugates whose peptide sequence has in position 4 D-homo-Phe amino acid (peptide derivatives 1 through 4 and 9 through 17), are in particular oriented toward effects involving stimulation of the process of melanogenesis, and they also have an antiallergic and antiinflammatory effect.

The peptide sequences according to the present invention can be obtained by any of the methods known to persons in the art, in particular by methods of chemical synthesis enabling to integrate different acids. In any case, taking into account the small dimension of the peptides, chemical synthesis is completely possible and allows to obtain very pure products.

Other characteristics of the conjugates according to the invention will become apparent from the examples below, which also illustrate the preparation method by way of chemical synthesis.

[page 6]

Example 1 : Synthesis of Conjugate 1 - A = Adipic Acid

Adipoyl - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - Gly - NH₂

The synthesis was realized with the Merrifield method in solid phase with MBHA resin and Fmoc (fluorenylmethoxycarbonyl) used as a protective group.

The following derivatives of amino acids were utilized:

Fmoc - GLY - OH,

Fmoc - TRP - OH,

Fmoc - Arg (Tos) - OH,

Fmoc - D-homo-Phe - OH,

Fmoc - His (Trt) - OH

Fmoc - Glu (chex) - OH, and

Fmoc - Me.Nle - OH,

which were coupled while using BOP as a coupling agent.

Each amino acid was used in excess (x 2) as was BOP (x 2) and each coupling was repeated twice.

Adipic acid was coupled in a similar manner, the Fmoc group was eliminated in each stage by piperidine (20%, in dimethyl formamide). The final deprotection was achieved in two stages:

a) trifluoroacetic acid (twice x 5 minutes)

b) anhydrous fluorhydric acid / p-cresol 95.5 (45 minutes).

Crude compound obtained with a yield of 78% was recovered in a 95.5% mixture of water/acetic acid and then lyophilized.

Compound P1 was obtained with a purity of 82% (HPLC). 100 mg of this compound was then purified with HPLC by using C18 for a column so that 65 mg of pure product was obtained.

Retention time = 17.04 minutes under the following conditions:

- column C8 (250 mm x 5 mm), UV 210 detection

- phosphate buffer solution triethylamine - acetonitrile 10 - 60 % in 15 minutes, the rate was 1.4 ml/minute.

Analysis of Amino Acids

Glu 1.02 - Gly 1.01 - His 1.00 - Arg 0.94 - D-homo-Phe 1.03 - (Tryptophan was not determined because it is degraded by acid hydrolysis).

Mass spectrum (FAB +) 1018.4/1126.5

[page 7]

Example 2 : Synthesis of Compound 5 - A = Adipic Acid

Compound **P2** was obtained by repeating the operation mode of Example 1 while FMOC-D-homo-Ph-OH was replaced by FMOC-para-fluoro-Phe-OH:

Adipoyl - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - Trp - Gly - NH₂

F = 120°C, decomposition. (α)_D - 7 (c = 0.4 DMF). HPLC : column C₁₈, 5 μ m, rate 7 mL/min, detection 279 nm, elution solvent TFA 0.1% / acetonitrile 77/23 v/v, retention time 30.45 min., ¹H RMN (DMSO-d₆) ppm: Me.Nle (4.76, 1.62, 1.24, 0.82) ; Glu (8.54, 4.32, 1.86-1.72, 2.24) ; His (8.09, 4.53, 2.95-2.82) ; Para-Fluro-Phe (8.09, 4.53, 3.00-2.78, 7.3-7.0); Arg (8.36, 4.29, 1.54-1.68, 1.45, 3.07); Trp (8.07, 4.53, 3.16-3.01, 10.80, 7.19, 7.56, 7.30, 6.96) ; Gly (8.18, 3067-3.54).

Example 3: Synthesis of Conjugate 1 - A - trans-10-hydroxy-2-decenoic acid

Compound **P3** was obtained by using the same operations as in an Example 1, while adipic acid was replaced by trans-10-hydroxy-2-decenoic acid:

trans-10-hydroxy-2-decenoyl - Me.Nle - Glu - His - D-Homo-Phe - Arg - Trp - Gly - NH₂.

F = 115°C, decomposition. (α)_D - 16 (c = 0.3 DMF). HPLC: column C₁₈, 5 μ m, rate 7 mL/min, detection 279 nm, elution solvent TFA 0.1% / acetonitrile 71/29 v/v, retention time 24.20 min., ¹H RMN (DMSO-d₆) ppm : Ac (1.84) ; Me.Nle (8.00, 4.15, 1.59-1.48, 1.23, 0.83) ; Glu (8.00, 4.15, 1.86-1.72, 2.19) ; His (8.00, 4.54, 3.00-1.88, 8.89, 7.26) ; D-Homo-Phe (7.98, 4.53, 2.99-2.78, 7.3-7.0) ; Arg (8.27, 4.29, 1.67-1.53, 1.46, 3.08) ; Trp (8.07, 4.54, 3.16-3.01, 10.80, 7.16, 7.56, 7.30, 7.04, 6.96) ; Gly (8.19, 3.68-3.54).

Example 4 : Synthesis of Conjugate 2 - A = α -amino-adipic acid

Compound **P4** was obtained by using the operations of Example 1, while adipic acid was replaced by α -amino adipic acid:

α -aminoadipoyl - M.Nle - Glu - His - D-Homo-Phe - Arg - Trp - NH₂.

F = 130°C, decomposition. (α)_D - 5 (c = 0.5 DMF). HPLC: column C₁₈, 5 μ m, rate 7 mL/min, detection 279 nm, elution solvent TFA 0.1% /

acetonitrile 77/23v/v, retention time 28.80 min., ¹H RMN (DMSO-d₆) ppm: Me.Nle (3.77, 1.62, 1.24, 0.82) : Glu (8.53, 4.32, 1.82-1.71, 2.25) : His (8.11, 4.53, 2.98-2.83) ; D-Homo-Phe (8.06, 4.47, 2.99-2.77, 7.25-7.1) ; Arg (8.32, 4.30, 1.69-1.55, 1.45, 3.07) : Trp (8.02, 4.59, 3.16-3.00, 10.78, 7.15, 7.58, 7.30, 7.04, 6.96).

Example 5 : Synthesis of Conjugate 3 - A = Sebacic Acid

Compound **5P** was obtained by repeating the operation mode of Example 1, without reactive FMOC - Gly - OH and FMOC - TRP - OH, while adipic acid was replaced by sebacic acid:

Sebacoyl - Me.Nle - Glu - His - D-Homo-Phe - Arg - NH₂.

F = 130°C, decomposition. (α)_D - 3.2 (c = 0.5 DMF). HPLC: column C₁₈, 5 μm, rate 7 mL/min, detection 279 nm, elution solvent TFA 0.1% / acetonitrile 77/23 v/v, retention time 21.86 min., ¹H RMN (DMSO-d₆) ppm: Me.Nle (4.70, 1.80, 2.30, 1.95) ; Glu (8.57, 4.30, 1.82-1.71, 2.25) : His (8.21, 4.55, 2.98-2.83) : Phe (8.09, 4.55, 2.99-2.77, 7.25-7.1) ; Arg (8.31, 4.30, 1.69-1.55, 1.45, 3.07) ; Trp (7.95, 4.61, 3.16-3.00, 10.78, 7.15, 7.58, 7.30, 7.04, 6.96) : Gly (8.32, 3.75).

Example 6 : Examination of Antiallergic Activity of Peptide Conjugates with a Hypersensitivity Test of Contact with Dinitrofluorobenzene (DNFB)

Material and Method

Female mice C57 BL/6JICO, 5 weeks old, divided into lots of ten animals (five per page) with free access to water and food, were submitted to a light cycle of twelve hours of light per twenty-four hours.

The animals in lots 1 through 6 received the products to be examined (conjugates 1 and 5, represented by compounds **P1** and **P2** prepared according to Example 1 and 2), daily by topical application on shaved skin on the back, provided in a solution of propylene glycol, with a constant volume of μl, namely during a period of five consecutive days.

Posology per Mouse and per Day

Compounds **P1** - Lots 1, 2 and 3 - 2.5 μg, 0.5 μg and 0.1 μg/mouse/day, respectively.

[page 9]

Compound P2 - Lots 4, 5 and 6 - 2.5 µg, 0.5 µg and 0.1 µg/mouse/day, respectively.

The animals in lot 10 served as test specimen animals (they received only 50 µl of propylene glycol by topical application for five days).

On the fifth day, thirty minutes after the last application, all the mice were sensitized with 25 µl of D N F B (2,4-dinitro-1-fluorobenzene (FLUKA CHEMIKA PURUM, at 97%, lot no. 33820890), at 2%, in a 4 to 1 mixture of acetone (SDS, ref. 0510) and triolein (FLUKIA), applied by the topical path to the dorsal region on shaved skin.

On the sixth day, the examination continued with a new sensitization by the application of DNFB.

On the eleventh day, the thickness of the ears of the mice was measured with a microscope (ROH 0 with 25 mm for 1/100 mm) in order to obtain base values, and the ears were afterwards stimulated with 20 µl of DNFB at 0.8%.

On the twelfth day, the thickness of the ears was measured again. The median value of the thickness of the ears was established for the mice in the lots that received the products to be examined, as well as for the mice in the test specimen lots.

The percentage of the eventual suppression is expressed by the following calculation:

$$\frac{T - E}{T} \times 100$$

wherein T expresses the percentage of the increase of the median thickness of the ears in the test specimen lot and E the median thickness in the lots which received products to be examined.

The results are listed in Table 1 below.

Table 1

| Conj. | Lot | % of Increase in Right Ear | % of Increase in Left Ear | % of Suppress. in Right Ear | % of Suppress. in Right Ear |
|-------|-----|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 1 | 17.50 | 17.80 | 69.80 | 69.57 |
| 1 | 2 | 19.00 | 19.50 | 67.24 | 66.66 |
| 1 | 3 | 21.50 | 22.00 | 62.93 | 63.39 |
| - | T | 58 | 58.50 | - | - |
| 5 | 4 | 17 | 16.65 | 70.48 | 71.39 |
| 5 | 5 | 18.60 | 19.00 | 67.70 | 67.35 |
| 5 | 6 | 20.80 | 21.50 | 63.88 | 63.05 |
| - | T | 57.60 | 58.20 | - | - |

T represents test specimen lots for each of the examined compounds.

Conjugates 1 and 5 suppressed in a highly significant manner, on the order of 69% and 71%, the cutaneous hypersensitivity reaction induced by administration of D N F B under the experimental conditions described above.

Example 7 : Examination of Antiinflammatory Activity of Conjugates 1 and 5 (Compounds P1 and P2)

Objective of the Examination:

To provide evidence of the inhibitory effect of conjugates 1 and 5 (compounds P1 and P2) on the production by fibroblasts stimulated by IL 1, with a metabolite of arachidonic acid, PGE2.

Methods:

1- A culture of pulmonary embryonic fibroblasts of human origin:

We have chosen to utilize the strain ATCC MRC5 maintained in the laboratory in a continuous fashion already tested by Cannon et al. (J. Immunol., 1986). After being transferred, the fibroblasts were cultivated in micropits. The inoculum consisted of 30,000 cells per pit; the nutritive medium was composed of RPMI 1640 (90%) and of decomplemented fetal calf serum

[page 11]

(SVF, 10%). The medium was changed every two days until the confluence of cells.

2 - Testing Procedure

Monocellular layers obtained in this manner are washed and then preincubated during a period of 24 hours in a fresh medium containing only 1% of SVF. The substances to be tested are added in media with different concentrations comprising between 10^{-6} and 10^{-4} M. After 20 minutes of incubation in the presence of the compounds, human recombinant IL 1 (Tebu, France) with a concentration of 5, 2.5 or 0.5 ng/ml in the medium was brought into contact with the cells for 18 hours. At the end of this incubation, the supernatants are prewashed and frozen at -80°C until the analysis. The monocellular layers were fixed with methanol.

3 - PGE 2 Assay:

The RIA assay was carried out according to the method described by Dray et al. (Europ. J. Invest. 1975). 3 series of tests were realized twice for each concentration of the examined product and for the controls. The results are expressed in pg/ μg of ADN. The inhibitory effect is expressed in percentage with respect to the controls.

In order to prevent any possible error due to measuring with an optical microscope system, the dose of AND was determined with the fluorometric method according to the protocol described by Brunk et al. (Analytical Biochem., 1979).

Tables 2 and 3 below show the first series of tests with the MRCC5 strain.

Table 2
Effect of Conjugate 1

| Concentration of IL 1 (ng) | Concentration of Conjugate 1 (M) | PGE2 pg/mg of AND | Percentage of Inhibition |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------|--------------------------|
| 2.5 | 0 | 389 ± 60 | - |
| | 10 ⁻⁴ | 179 ± 50 | 53 |
| | 10 ⁻⁵ | 232 ± 45 | 40 |
| | 10 ⁻⁶ | 292 ± 68 | 24 |
| | 10 ⁻⁷ | 364 ± 68 | 6 |
| | 10 ⁻⁸ | 335 ± 50 | 13 |
| | 10 ⁻⁹ | 320 ± 43 | 17 |
| 0.5 | 0 | 288 ± 25 | - |
| | 10 ⁻⁴ | 113 ± 25 | 60 |
| | 10 ⁻⁵ | 176 ± 37 | 38 |
| | 10 ⁻⁶ | 231 ± 55 | 19 |
| | 10 ⁻⁷ | 249 ± 60 | 13 |
| | 10 ⁻⁸ | 258 ± 35 | 10 |
| | 10 ⁻⁹ | 364 ± 56 | - |

The results demonstrate a good inhibitive effect of compound 1 and the relationship of effect to the dose. This effect does not depend on the concentration in IL 1. No effect was observed in the two cases starting from 10⁻⁷.

Table 3
Effect of Conjugate 1

| Concentration of IL 1 (ng) | Concentration of Conjugate 5 (M) | PGE2 pg/mg of AND | Percentage of Inhibition |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------|--------------------------|
| 55 | 0 | 7576 ± 310 | - |
| | 10 ⁻⁴ | 2964 ± 184 | 60 |
| | 10 ⁻⁵ | 4580 ± 230 | 38 |
| | 10 ⁻⁶ | 4900 ± 340 | 34 |
| | 10 ⁻⁷ | 6150 ± 365 | 17 |
| | 10 ⁻⁸ | 6142 ± 255 | 17 |
| | 10 ⁻⁹ | 5047 ± 279 | 32 |

Conjugates 1 and 5 possessed the inhibitory power of the effect of IL 1 and PGE 2. Blockage of the receptors could have been very significant for this effect.

Example 8 : Examination of the Effect of Conjugates 1 and 5 on Melanogenesis of Mice after Topical Application in the Form of a Dermal Creme (Warren Technique)

Material and Method

1) Material

- **Dermal excipient No. 66**

Lano - vaseline - Ac
oil of pharmacological vaseline,
bee's wax ethoxyl
purified lanolin
PEG - 200.

- **Dermal Formulas**

Conjugates 1 and 5 (represented by compounds P1 and P2), incorporated with a ratio of 10×10^{-5} M in dermal excipient No. 66.

- **Animal**

Mice DBA/2 IFA - CREDO, 5 weeks old.

2) Method (Raphael WARREN PhD & Coll., 0022 - 202, 1987, Society for Investigate Dermatology [sic]).

- A dorsal bald patch is created in a defined position after depilation on each animal.
- The products to be tested are applied by means of a massage with the rate of 2 applications per day, at 50 μ l of each preparation for 5 days.
 - Two days after the last application, the animals are sacrificed and fractions of 50 mg around the area of the treated skin are sampled.
- Each sample is dried by liophilization and weighed.
- The fragments of skin are then submitted to enzymatic hydrolysis with protease K for 72 hours at 45°C (Protease K, Merck - 25%).
- 500 μ l of Na₂CO₃ and 20 μ l of H₂O₂ at 35% is added to the obtained hydrolyses.
- Incubation is initiated for 30 minutes at 80°C.
- After cooling, 200 μ l of chloroform / methanol (2 vol/1 vol) is added to each sample.
- Centrifugation is performed with 10,000 g.
- Aqueous phase (200 μ l) is allotted to the pits of microplate "NUNC"

- Melanin Assay

- Melanin assay was performed with 405 nm with Multiskan - Titertek - MCC - 340, in comparison to the standard melanin range Sigma M. 8631.

- Results

The results are expressed as a percentage of melanin compared to excipients considered to be test specimens.

- | | |
|--------------------|--|
| I Cream 1 - 5 | 10 ⁻⁵ M of conjugate 1 per 50 μ l of cream. |
| II Cream 5 - 5 | 10 ⁻⁵ of conjugate 5 per 50 μ l of cream. |
| III Excipient 66 - | as test specimen T. |

The median values of the results in 15 measurements are listed in Table 4 below.

Table 4

| Sample | % of Melanin/Test Specimen |
|--------|----------------------------|
| I | 80 % |
| II | 12 % |
| III | 5 % |

[page 15]

The percentage of stimulation is calculated as a function of values QE and QT, by using QE as the median quantity of melanin per mg of the skin of a tested sample and QT as the median quantity of melanin per mg of the skin of a test specimen, according to the formula:

$$\% \text{ of stimulation} = \frac{QE - QT}{QT} \times 100$$

Dermal cream 1, administered by topical path, induced in a highly significant manner synthesis of melanin on epidermal level (+ 75%). This effect is in agreement with the object of the present invention and it is linked to the chemical structure of conjugate 1 which contains the group D-homo-Phe.

In contrast to that, dermal cream 5, administered by topical path, did not have a stimulating effect on epidermal melanogenesis. This absence of an effect is linked to the presence of the para-fluoro-Phe group in the conjugate.

These results were confirmed with the examination of melanogenesis according to the so-called "CLOUDMAN" technique with a culture of melanocytes in vitro, when CLOUDMAN melanoma cells were used on rats.

The total of the results obtained is in agreement with the object of the present invention, whose purpose was to realize active conjugates by the topical path, and whose antiallergic and antiinflammatory effects can be separated from the effect on melanogenesis according to anticipated applications.

Example 9 : Comparative Examination of the Effect of Conjugates and Their Peptide Structures on Hypersensitivity during Contact with DNFB

Material and Method

The method used was the same as the one described above in Example No. 4, for hypersensitivity during contact induced in rats with DNFB.

- Examined Products

Lot I: trans-10-hydroxy-2-decenoyl - Me-Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - Gly - NH₂

- Conjugate 1 represented by compound P3.

Lot II: Me-Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - Gly - NH₂

LOT T: test specimen = trans-10-hydroxy-2-decenoic acid.

[page 16]

Solvent: propylene glycol employed previously for a test specimen in Example 6.
The effect on the test specimen was measured with each testing.

- Testing and Posology

| Lot : Used Doses | Lot II: Used Doses |
|---|---|
| 1 = 0.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ | 4 = 0.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ |
| 2 = 0.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ | 5 = 0.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ |
| 3 = 2.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ | 6 = 2.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ |

Test Specimen: 10 ng of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid per mouse and per day.

On the fifth day, thirty minutes after the last application, all the mice were sensitized with 25 μl of DNFB (2,4-dinitro-1-fluorobenzene (FLUKA CHEMIKA PURUM, at 97%, lot No. 33820890)) at 2% in a 4 to 1 mixture of acetone (SDS ref. 05510) and triolein (FLUKA), applied by the topical path on the dorsal region of shaved skin. On the sixth day, a new sensitization was performed by the application of DNFB. On the eleventh day, the thickness of the ears of the mice was measured by using a micrometer (ROCH, at 25 mm to 1/100 mm) in order to obtain a base value. After that, the ears were stimulated with a topical application of 20 μl of DNFB at 0.8%. On the twelfth day, the thickness of the ears was measured again. The median value of the thickness of the ears was established for the mice in the lots that received the products to be examined, as well as for the mice in the test specimen lot. The percentage of eventual suppression is expressed with the same equation as in Example 6.

The results are listed in Table 5 below.

Table 5

| Lot | Dose* | % of Increase in Left Ear | % of Increase in Right Ear | % of Suppress. in Left Ear | % of Suppress. in Right Ear |
|-----|-------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| I | 2.5 | 11.0 | 11.40 | 80.28 | 79.64 |
| I | 0.5 | 13.00 | 12.90 | 76.70 | 76.96 |
| I | 0.1 | 15.60 | 14.60 | 72.04 | 73.92 |
| T | 0.01 | 55.80 | 56.00 | - | - |
| II | 2.5 | 17.60 | 18.50 | 69.17 | 67.82 |
| II | 0.5 | 24.00 | 22.80 | 57.96 | 60.34 |
| II | 0.1 | 32.00 | 30.20 | 43.95 | 47.47 |
| T | 0.1 | 57.10 | 57.50 | - | - |

* $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$.

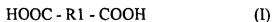
A suppression of cutaneous hypersensitivity corresponding to 80% was observed with the dose of 2.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ with conjugate 1 (compound P3) according to the invention; a clear relationship between the doses/effects with the doses of 0.1, 0.5 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$. In contrast to that, when only the peptide was used, a suppression of cutaneous hypersensitivity corresponding to 47% was observed with the dose of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$, with the doses of 0.5 μg and 2.5 μg , so that the suppressive response was on the order of 60 and 69%. Finally, no suppressive effect on cutaneous hypersensitivity was observed with the administration of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid in a propylene glycol solution.

When administered by the topical path and under the test conditions described, conjugate 1 according to the invention induces in a highly significant manner suppression of cutaneous hypersensitivity in mice.

CLAIMS

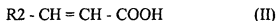
1 - A peptide conjugate, characterized by the fact that it comprises one peptide sequence including at least one sequence of 4 amino acids derived from α MSH, whether the amino acids are in a natural form or not, said sequence being conjugated, chemically or physically with acids selected from:

- di-carboxylic acids according to General Formula I:



wherein R1 is a straight or branched alkylene radical having at least 3 carbon atoms, and preferably from 3 to 10 carbon atoms, being eventually substituted, in particular by one or more amino or hydroxy groups, and

- α -monounsaturated fatty acids in the cis or trans configuration, preferably trans, according to General Formula II:



wherein R2 is an alkyl radical, straight or branched, comprising at least 6 carbon atoms, preferably 6 to 10 carbon atoms, substituted by an amino, hydroxy or oxo group.

2 - The conjugate according to claim 1, characterized by the fact that the sequence of amino acids is linked to a selected acid in the form of a salt, ester or amid.

3 - The conjugate according to one of the claims 1 or 2, characterized by the fact that the acids according to General Formulas I or II are preferably selected from carboxylic diacids of Formula I, in which R1 is an alkylene radical in C_4 - C_8 , substituted or not, in particular α -adipic acids, α -amino adipic acids and derivatives thereof, sebacic acid and derivatives thereof, fatty α -monounsaturated acids according to Formula II, in which R2 is an alkyl radical, straight or branched in C_7 , in particular hydroxydecanoic and decenoylic acids, in the form of corresponding salts, esters or amides.

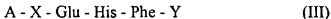
4 - The conjugate according to claim 1, characterized by the fact that acids according to General Formulas are preferably selected from adipic acid, α -amino adipic acid, sebacic acid, trans - 10 - hydroxy - Δ^2 - decenoic acid and trans-oxo - 9 - decene - 2 - oic acid.

5 - The conjugate according to one of the claims 1 through 4, characterized by the fact that the peptide sequence comprises at least one of the following sequences:

- Glu - His - Phe -
- His - Phe - Arg -
- Glu - His - Phe - Arg -

wherein Phe is phenylalanine or a halogenated derivative of phenylalanine, in particular D-homo-Phe and parafluoro-Phe amino acids, which can be in the form D, L or D, L.

6 - The conjugate according to one of the claims 1 through 5, characterized by the fact that these are conjugates according to General Formula III:



in this formula:

A indicates an acid according to General Formula I or II or such as defined in claims 1, 3 and 4,

X indicates the group 5-Me.Norleucin (Me.Nle), 2-N-Me-Norceuline (N-Me.Nle), OH or NH₂,

Y indicates an Ar - Z or Z radical, in which Z is Trp - Gly - OH, Trp - OH, OH, Trp - Gly - NH₂, Trp - NH₂, or NH₂,

Phe indicates a D-Homo-Phe radical or para-fluoro-Phe radical, the amino acids being the form D, L or D, L.

7 - The conjugate according to one of the claims 1 through 4, characterized by the fact that they are selected from the following peptide derivatives:

- 1 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - Gly - NH₂
- 2 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - NH₂
- 3 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - NH₂
- 4 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - NH₂
- 5 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - NH₂
- 6 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - Trp - NH₂
- 7 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - NH₂
- 8 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - NH₂
- 9 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe-Arg-Trp-Gly - NH₂
- 10 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo -Phe- Arg - Trp - NH₂
- 11 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - NH₂
- 12 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - NH₂
- 13 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - Gly - OH
- 14 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - OH

[page 20]

- 15 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - OH
- 16 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - Gly - OH
- 17 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phe - Arg - Trp - OH
- 18 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - Trp - Gly - OH
- 19 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - Trp - OH
- 20 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - trp - Gly - OH
- 21 A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - Trp - Gly - OH
- 22 A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phe - Arg - Trp - OH

wherein A is an acid according to General Formulas I or II as defined in claims 1, 3 and 4, as well as derivatives of these molecules in the form of salts of esters or amines.

8 - The conjugates according to one of the claims 1 through 7, as medications.

9 - A medication according to claim 8, useful for treatment of allergies, in particular cutaneous, inflammatory reactions and melanogenesis disorders, which can be used in human and veterinary medicine.

10 - A galenic composition, characterized by the fact that it comprises a conjugate according to one of the claims 1 through 7.

11 - Galenic compositions according to claim 10, characterized by being dermo-cosmetologic preparations in the form of solutions, emulsion lotions, or creams employed as an accelerator for tanning of skin, without exposure to ultraviolet rays.

12 - Galenic compositions according to one of the claims 10 or 11, characterized by being galenic preparations in the form of solutions, lotions, cream, or a spray.

FRENCH REPUBLIC

SEARCH REPORT

National Registration No.

NATIONAL INSTITUTE issued based on the last claims

FA 5150941

for INDUSTRIAL PROPERTY filed before the search was begun

FR 9506909

2735131

| DOCUMENTS CONSIDERED RELEVANT | | Claims relevant to the examined application | Technical Domains Searched (Int Cl. 6) |
|-------------------------------|--|---|--|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage | | |
| X | FR-A-2 691 465 (PF MEDICAMENT), November 26, 1993 * page 3, line 13 - page 4, line 9; claims 1, 5, 8, 9 * --- | 1-3, 5, 8-12 | C07 K A61 K |
| X | EP-A-0 389 950 (LION CORP) October 3, 1990 * page 2, line 48 - page 3, line 6; claims * --- | 1, 2, 8-12 | |
| X | BIOCHEMISTRY Vol. 32, No. 45, November 16, 1993 pages 12264-12272, XP 000403772 ITO, A. S., et al., 'STRUCTURE-ACTIVITY CORRELATIONS OF MELANOTROPIC PEPTIDES IN MODEL LIPIDS BY TRYPTOPHAN FLUORESCENCE STUDIES' * page 12265, left column, indented paragraph 4* --- | 1 | |
| A | WO-A-95 08564 (INST EUROP DE BIOLOG CELLULAIRE ; DUSSOURD D HINTERLAND LUCIEN (FR) ; March 30, 1995 * page 1, line 12 - line 21; claims; examples * * page 4 * --- | 1-12 | |
| A | EP-A 0 517 211 (TEIKOKU SEIYAKU KK COMPANY) December 9, 1992 * page 3, line 6 - line 10 * * page 3, line 29 - line 36; claims 1, 2, 6 * --- | 1-12 | |

IEPO FORM 1503 0182 (PO413)

| | |
|---|--|
| Date of the completion of the search: March 7, 1996 | Examiner: Furhr, C |
| CATEGORIES OF CITED DOCUMENTS: | T: theory or principle on which the invention is based |
| X: document of particular relevance per se | E: patent document published on or after the filing date |
| Y: document of particular relevance in combination with another document in the same category | D: cited in the application |
| A: relevant in connection with at least one claim or with general prior art technology | L: cited for other reasons |
| O: Non-written disclosure | ----- |
| P: Intercalary document | "&": member of the same family, corresponding document |